

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA**

SOFIA NOBRE NOVAIS

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NO DESENVOLVIMENTO DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS
C57/BL6 EXPOSTOS A CARCINOGENESE QUÍMICA**

UBERABA-MG

2022

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA

SOFIA NOBRE NOVAIS

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NO DESENVOLVIMENTO DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS
C57/BL6 EXPOSTOS A CARCINOGENESE QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto

UBERABA-MG

2022

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Novais, Sofia Nobre.
N856e Efeito de uma dieta hipercalórica no desenvolvimento de carcinomas de células escamosas na língua de camundongos C57/BL6 expostos a carcinogênese química / Sofia Nobre Novais. – Uberaba, 2022.
28 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biopatologia. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto.

1. Odontologia. 2. Carcinogênese. 3. Boca – Câncer. 4. Boca - Cuidado e higiene. 5. Boca – Doenças. I. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biopatologia. II. Título.

CDD: 617.6

SOFIA NOBRE NOVAIS

EFEITO DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS C57/BL6 EXPOSTOS A CARCINOGENESE QUÍMICA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

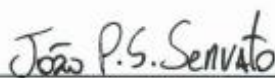
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 04/03/2022

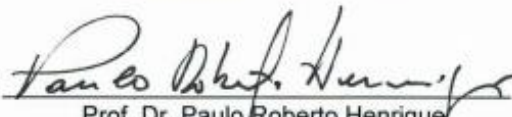
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. João Paulo Silva Servato
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Paulo Roberto Henrique
Universidade de Uberaba / UNIUBE

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. A inflamação crônica derivada da obesidade, favorece o desenvolvimento e progressão do câncer. Fatores dietéticos são capazes de modificar o processo de carcinogênese em órgãos e tecidos. Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a influência de uma dieta hipercalórica no desenvolvimento e progressão de carcinomas de células escamosas da língua. Para isso, foram utilizados 59 camundongos machos da linhagem C57/BL-6, com 60 dias de idade e peso médio de 30 gramas. A dieta hipercalórica foi chamada de AIN, enquanto que para a dieta padrão foi colocado a sigla DPA. O carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido nítrico (4NQO) foi administrado de acordo com a descrição de cada grupo. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a ingestão de água, água com carcinógeno (4NQO), dieta balanceada e dieta hipercalórica. Nesse sentido, foram criados os grupos (AIN/4NQO; N= 18); (DPA/4NQO; N= 23); (AIN/H₂O; N= 7), e (DPA/H₂O; N= 11). A indução dos tumores foi realizada com 4NQO até a 16^o semana, após este período os camundongos receberam água filtrada e as respectivas dietas até a 23^a semana, quando foram eutanasiados. Uma porção do sangue periférico foi retirada para a análise glicêmica, enquanto língua e linfonodos regionais foram processadas para a análise histopatológica. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Graph Pad Prism* (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA). Os dados mostraram que a dieta hipercalórica induziu obesidade (índice de Lee $\geq 0,3$) em 100% dos animais, e a exposição ao 4NQO provocou carcinoma na língua em 50% dos camundongos tratados com o carcinógeno. A associação entre dieta hipercalórica e 4NQO promoveu um aumento de 16% na mortalidade dos camundongos. Houve uma redução no consumo hídrico em 100% dos animais tratados com 4NQO. Alterações glicêmicas sugestivas de Diabetes Mellitus foram encontradas em 100% dos animais expostos ao 4NQO. Análises histopatológicas das línguas indicaram alterações displásicas em 60% dos camundongos tratados com 4NQO, independente da dieta. Aproximadamente 28% dos animais do grupo AIN/4NQO apresentaram câncer na língua, contra 22% do grupo PAD/4NQO. Contudo, tais diferenças não foram estatisticamente significativas. Além disso, não foram encontrados focos metastáticos nos linfonodos de ambos os grupos. Embora o

agravo de várias doenças esteja associado à obesidade, os dados exibidos não foram conclusivos a tal inferência. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer se a obesidade contribuiu ou não para a o estabelecimento e progressão de na língua.

Palavras-chave: dieta hipercalórica; carcinogênese; língua; camundongos

ABSTRACT

Obesity is a chronic, multifactorial disease characterized by excessive accumulation of adipose tissue in the body. Chronic inflammation derived from obesity favors the development and progression of cancer. Dietary factors are to modify the process of carcinogenesis in organs and tissues. In this sense, the aim of the study was to evaluate the influence of a hypercaloric diet on the development and progression of squamous cell carcinomas of the tongue. For this, 59 male mice of the C57/BL-6 strain were used, with 60 days of age and average weight of 30 grams. The hypercaloric diet was called AIN, while for the standard diet the acronym DPA was placed. Carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) was administered according to the description of each group. The animals were divided into four groups according to water intake, carcinogenic water (4NQO), balanced diet and hypercaloric diet. In this sense, the groups were created (AIN/4NQO; N= 18); (DPA/4NQO; N= 23); (AIN/H₂O; N= 7), and (DPA/H₂O; N= 11). Tumor induction was performed with 4NQO until the 16th week, after this period the mice received filtered water and their diets until the 23rd week, when they were euthanized. A part of peripheral blood was removed for glycemic analysis, while tongue and marginal lymph nodes were processed for histopathological analysis. Statistical analyses were performed with the aid of the Graph Pad Prism program (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). The data showed that the hypercaloric diet induced obesity (Lee \geq 0.3) index in 100% of the animals, and exposure to 4NQO caused carcinoma of the tongue in 50% of the mice treated with carcinogen. The association between hypercaloric diet and 4NQO promoted a 16% increase in mouse mortality. There was a reduction in water consumption in 100% of the animals treated with 4NQO. Glycemic alterations suggestive of Diabetes Mellitus were found in 50% of the animals exposed to 4NQO. Histopathological analysis of the tongues indicated dysplastic alterations in 60% of the mice treated with 4NQO, regardless of the diet. Approximately 28% of the animals in the AIN/4NQO group had cancer in the tongue, against 22% of the DBP/4NQO group. However, such differences were not statistically significant. In addition, no metastatic foci were found in the lymph nodes of both groups. Although the disease of several diseases is associated with obesity, the data shown were not conclusive to such inference. Thus, more studies are needed to clarify whether or not obesity contributed to the establishment and progression of tongue.

Keywords: hypercaloric diet; carcinogenesis; tongue; Mice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo hídrico ao longo de 24 semanas.....	14
Figura 2. Consumo médio de gramas ingeridas pelos camundongos.....	15
Figura 3. Consumo médio de calorias ingeridas pelos camundongos.....	15
Figura 4. Ganho de peso corporal ao final da 23ª semana.....	16
Figura 5. Análises glicêmicas de camundongos tratados ou não com 4NQO e dietas hipercalórica e padrão.....	17
Figura 6. Lesões em línguas de camundongos expostos ao 4NQO.....	18
Figura 7. Corte histológico da língua de camundongos c57/BL6 tratados ou não com 4NQO e dieta hipercalórica.....	19
Figura 8. Tipos de alterações histopatológicas presentes na língua de camundongos c57/BL6 tratados com 4NQO.....	20
Figura 9 Comparação das alterações de displasia leve/moderada e intensa presentes nas línguas de camundongos tratados com 4NQO.....	20
Figura 10. Presença de carcinomas nos grupos exposto ao 4NQO.....	21
Figura 11. Corte histológico dos linfonodos de camundongos c57/BL6.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de animais por grupo.....	8
Tabela 2. Composição da dieta padrão balanceada.....	9
Tabela 3. Composição da dieta experimental AIN-93 modificada.....	9
Tabela 4. Média do peso corporal e Índice de Lee.....	17
Tabela 5. Mortalidade e sobrevida dos camundongos.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg/mL microgramas por mililitros

4NQO 4- nitroquinolona-1- óxido nítrico

AIN dieta experimental

CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal

CCEB Carcinoma de Células Escamosas Bucal

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DM Diabetes Mellitus

DM2 Diabetes Mellitus tipo 2

DMBA dimetilbenzoantraceno

DPA dieta padrão

g/cm³ gramas por centímetros cúbicos

HE Hematoxilina e Eosina

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de massa corporal

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	5
3. JUSTIFICATIVA	6
4. OBJETIVOS	7
4.1 Objetivo geral	7
4.2 Objetivos específicos	7
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
5.1 Manejo dos animais	8
5.2 Protocolo de preparo do 4-QNO e tratamento	10
5.3 Eutanásia e coleta de sangue	10
5.4 Índice de Lee	10
5.5 Medição dos níveis de glicose em jejum.....	11
5.6 Coleta de órgãos e tecidos	11
5.7 Processamento histológico	11
5.8 Análise microscópica	12
5.8.1 Exame microscópico da língua.....	12
5.9 Análise estatística.....	12
6 RESULTADOS	14
6.1 Consumo hídrico	14
6.2 Análise do consumo dietético – resto ingesta.....	14
6.3 Ganho de peso corporal	16
6.4 Índice de Lee	16
6.5 Níveis glicêmicos	17
6.6 Mortalidade e sobrevida	18
6.7 Macroscopia da língua	18
6.8 Análise histopatológica da língua	19
7. DISCUSSÃO	22
8. CONCLUSÃO.....	27
ANEXO I	34

1. INTRODUÇÃO

A obesidade, considerada uma doença crônica multifatorial, é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. É fator de risco para doenças graves que desencadeiam diversas alterações no organismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2020), os índices de pessoas obesas triplicaram desde à década de 70, explicando assim, o fato de que a maior parte da população mundial vive em países com altos índices de mortalidade provenientes da obesidade e sobrepeso.

Sua condição é proveniente de um desequilíbrio energético positivo que vem de um aumento na ingestão de alimentos altamente energéticos (ricos em lipídeos e açúcares), concomitante à inatividade física, causando um acúmulo de tecido adiposo corporal. Desta forma, tais fatores acabam facilitando o ganho de calorias e, conseqüentemente, o acúmulo de gordura no corpo (SOUZA *et al.*, 2018; OMS, 2020). Assim, o alto teor de gordura corporal como fator constante, acarreta um número variado de conseqüências ao organismo, como doenças associadas à resistência insulínica, distúrbios cardiovasculares (GREGG *et al.*, 2005), distúrbios biliares e neoplasias (CALLE *et al.*, 2003). O acometimento destas doenças tem como resultado a redução da qualidade e expectativa de vida, além de agravar o prognóstico dos indivíduos acometidos.

Nos últimos anos, o entendimento da patogênese de tais comorbidades em pacientes obesos, tem-se dado pela resposta inflamatória do tecido adiposo, considerado um órgão metabolicamente ativo, estritamente importante para o organismo (LEITE, *et al.*, 2009). O tecido adiposo é considerado o maior órgão reservatório energético do organismo (GEHRKE; PEREIRA, 2007), responsável pela homeostase dos ácidos graxos do organismo, regulação do armazenamento de energia e comunicação com o sistema nervoso e gastrointestinal, desenvolvendo um importante papel na resposta inflamatória crônica em condições autócrinas, parácrinas e endócrinas (SPERETTA *et al.*, 2014). Assim, a inflamação crônica atua diretamente nas condições fisiológicas da obesidade, uma vez que, em determinado momento do desenvolvimento desta comorbidade, há uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias. (STONE *et al.*, 2018).

O câncer é definido como uma desordem genética causada por inúmeras mutações no material genético (DNA), as quais são adquiridas de forma espontânea ou provenientes de agressões do ambiente (KUMAR *et al.*, 2013). As alterações genéticas causadas por mudança no ambiente tumoral, começam a transmitir informações inadequadas para a execução das atividades celulares. As células então começam a sofrer uma série de proliferações desordenadas, desencadeando o crescimento de células anormais. Um tumor pode permanecer dentro do tecido em que se originou, condição denominada *in situ*, ou pode começar a invadir os tecidos próximos, linfa e vasos sanguíneos, neste caso é chamado de invasivo (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2007).

A característica principal do câncer é que ele não se desenvolve rapidamente, mas sim por um período prologando de tempo acompanhado de uma extensa e complexa sucessão de mudanças genéticas. Essas mudanças fazem com que as células pré-cancerosas adquiram características capazes de desencadear o crescimento de células neoplásicas malignas. Há duas categorias de genes que desempenham papéis importantes no desencadeamento do câncer, controlando o ciclo celular e a sequência de eventos que aumentam e dividem as células. A categoria proto-oncogenes estimula a divisão celular, enquanto os genes supressores de tumor, a inibe. Quando há mutação de ambas as categorias, elas são responsáveis por grande parte da divisão celular descontrolada que ocorre no câncer (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2007).

A obesidade tem sido implicada como importante fator de risco para vários tipos de câncer, e é possível que esse seja o segundo maior fator de risco modificável, atrás somente do tabagismo. A maioria das evidências que ligam dietas com altos níveis de lipídeos e obesidade, ao risco de câncer provêm de grandes estudos de coorte, os quais relatam que, a gordura corporal, quando não está em excesso, favorece a redução do risco do desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Além disso, pesquisas experimentais apontam a perda de peso proposital como uma prevenção do câncer (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese que contemplam a ligação entre obesidade e câncer, destacam-se o eixo anormal de insulina/IGF-1, hiperinsulinemia e resistência à insulina, sinalização hormonal desregulada, metabolismo de ácidos graxos e inflamação crônica do tecido adiposo,

alterações na produção de tecido adiposo de adipocinas e fatores de crescimento vascular, estresse oxidativo, desreguladores endócrinos e alterações na função imune (DE PERGOLA & SILVESTRIS, 2013; STONE *et al.*, 2018).

Muitos fatores dietéticos já foram reportados como capazes de modificar o processo de carcinogênese em diferentes órgãos e tecidos provenientes de humanos e de roedores. Por exemplo, dietas com altos níveis de lipídeos foram associados com promoção do potencial carcinogênico de glândulas mamárias, cólon, pulmão e pâncreas em vários estudos experimentais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; FOWLER; AKINYEMIJU *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017; KARUNANITHI; LEVI, 2018). Embora vários tipos de câncer sejam associados a dietas com altos níveis de lipídeos e com a obesidade, muito pouco se sabe sobre a inter-relação dessas condições e o desenvolvimento e progressão de neoplasias bucais (AMTHA *et al.*, 2009; BRADSHAW *et al.*, 2012; BRAVI *et al.*, 2013; SECCHI *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2021).

Em um estudo coorte, foi constatado que a obesidade foi associada ao aumento de cinco vezes no risco de morte por Carcinoma de Células Escamosas Bucal (CCEB) na língua (IYENGAR *et al.*, 2014). A obesidade, através do desencadeamento da perturbação do microambiente imunológico, pode promover o desenvolvimento de cânceres, incluindo o CCEB na língua (PENG *et al.*, 2021). O CCEB, pertencente ao grupo dos tipos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, é um dos tumores malignos mais comuns com uma taxa de acometimento elevada nos últimos anos. O seu desenvolvimento começa em todo o epitélio de revestimento e pacientes portadores possuem um prognóstico ruim, com taxas de sobrevivência global significativamente baixas (CHEN *et al.* 2019).

O CCEB caracteriza-se por manifestações clínicas e histopatológicas. Clinicamente, inicia-se com lesões características de placas brancas ou hiperemiadas (leucoplasia, eritroplasia e mista). Além disso, crescimento da mucosa, inchaço, dor e nódulos no pescoço podem ser encontrados em casos avançados (BARNES *et al.*, 2005). Histologicamente, as lesões são classificadas de acordo com as alterações epiteliais como hiperqueratose, hiperplasia e acantose ou alterações pré-neoplásicas de displasia leve, moderada e grave. O CCEB é proveniente de uma displasia epitelial com proliferação celular de células escamosas que degradam a membrana basal. A

degradação favorece invasão de tecidos saudáveis e o desenvolvimento de metástases (RIVERA & VENEGAS, 2014).

A indução de tumores na cavidade bucal de roedores por substâncias carcinogênicas, teve início com as investigações de Salley (1954) que mostrou a presença de carcinomas celulares escamosos em mucosa oral de hamsters, produzidos pela indução à carcinogênese por aplicação tópica de diversos agentes cancerígenos. Ademais, a fim de complementar seus estudos, Salley (1957) identificou estágios precedentes da carcinogênese induzida e sua evolução. Desde então, a utilização de modelos para indução à carcinogênese tem sido frequentemente relatada na literatura (DAYAN *et al.*, 1997; KANDARKAR *et al.*, 1998; IDE *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2016; BAUMAN *et al.*, 2016; VIARISIO *et al.*, 2016; OGHUMU *et al.*, 2016).

A aplicabilidade desses modelos tem contribuído para o conhecimento das bases moleculares e bioquímicas das neoplasias dessas regiões, pois estes métodos produzem um espectro de alterações moleculares e fenotípicas admitidamente similares às encontradas nos tumores de seres humanos. Entre estas alterações incluem: mutações e/ou alteração na expressão de genes específicos ligados a diferenciação e ao controle do ciclo celular, mudanças no padrão de maturação epitelial e desregulação da proliferação celular (CHAN & READE, 1998; SHKLAR, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 2000; WANI *et al.*, 2001).

Identificou-se que, modelos experimentais de camundongos podem desenvolver CCEB e são instrumentos de estudos para o entendimento do acometimento desenvolvimento de tumores, bem como o surgimento de novas terapêuticas (CHEN *et al.*, 2019). Desta maneira, trabalhos experimentais podem controlar melhor os vieses e promover maior conhecimento sobre a inter-relação de dietas hipercalóricas e obesidade no desenvolvimento de neoplasias dos tecidos de revestimento da cavidade oral.

2. HIPÓTESE

A obesidade adquirida pelo desequilíbrio calórico contribui para um pior prognóstico de carcinoma de células escamosas bucal em línguas de camundongos c57/BL6.

3. JUSTIFICATIVA

Muitos fatores dietéticos já foram reportados como capazes de modificar o processo de carcinogênese em diferentes órgãos e tecidos provenientes de humanos e de roedores. Dietas com altos níveis de lipídeos foram associados com promoção do potencial carcinogênico de glândulas mamárias, cólon, pulmão e pâncreas em vários estudos experimentais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; FOWLER & AKINYEMIJU *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017; KARUNANITHI & LEVI, 2018). Embora vários tipos de câncer sejam associados a dietas com altos níveis de lipídeos e com obesidade, pouco se sabe sobre a inter-relação dessas condições e o desenvolvimento e progressão de neoplasias bucais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o papel de uma dieta hipercalórica no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal, obtido por indução experimental de carcinogênese química em camundongos C57/BL-6.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar volume hídrico consumido de cada grupo;
- Avaliar consumo dietético de cada grupo;
- Avaliar evolução do peso corporal de cada grupo (IMC);
- Avaliar mortalidade e sobrevivência global;
- Coletar língua e linfonodos regionais para análise histopatológica;
- Diagnosticar microscopicamente as displasias e carcinomas nas línguas dos camundongos expostos ou não à dieta hipercalórica e tratados com 4NQO;
 - Avaliar a formação de metástase das células tumorais nos linfonodos regionais através de análise microscópica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEEAA), sob o protocolo de número 019/2018 (ANEXO I).

5.1 Manejo dos animais

Para a realização deste trabalho, foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Uberlândia, 59 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idade de 60 dias e peso médio inicial de 30 gramas. Os animais foram divididos em quatro grupos distintos de acordo com a Tabela I. A dieta hipercalórica foi chamada de AIN, enquanto para a dieta padrão foi colocado a sigla DPA. O carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido nítrico (4NQO) foi administrado de acordo com a descrição de cada grupo. O N amostral foi definido através da utilização do teste t com poder estatístico de 80% e alfa de 0,05.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade de Uberaba, em caixas de polietano forradas com maravalha, à uma temperatura de 22°C a 26°C, em ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro, com dieta e água *ad libitum*.

Tabela 1 – Quantidade de animais por grupo.

Grupos	Descrição	n
AIN/4NQO	4NQO* + Dieta hipercalórica	18
DPA/4NQO	4NQO* + Dieta padrão	23
AIN/H2O	Água + Dieta hipercalórica	7
DPA/H2O	Água + Dieta padrão	11
Total:		59

*Os animais foram tratados com o carcinógeno 4NQO por 16 semanas consecutivas.

Desses animais, 41 foram tratados com o 4NQO por 16 semanas, sendo 18 associados à dieta hipercalórica e outros 23 com a associação de uma dieta padrão. Além disso, 18 camundongos participaram de um grupo controle (camundongos não tratados com 4NQO, apenas com água filtrada), sendo 7 expostos à dieta hipercalórica e 11 à dieta padrão. A ingesta do carcinógeno foi realizada até a 16ª semana, após este prazo todos os camundongos receberam água filtrada e as respectivas dietas até a 23ª semana.

De acordo com o grupo de estudo os camundongos receberam uma dieta padrão comercial (LABCIL®, São Paulo, Brasil) ou a dieta hipercalórica.

A dieta padrão é uma dieta comercial (DPA), que fornece 340Kcal a cada 100 gramas consumidas (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição da dieta padrão balanceada.

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%
Amido	39,75	251,8	63,88
Maltodextrina	13,2		
Açúcar	10		
Caseína	20	80	20,26
Óleo de soja	7	63	15,95
Fibra	5		
L-cistina	0,3		
Bitartarato de Colina	0,25		
Tert-butilhiroquinona	0,0014		
Vitamina	1		
Mineral	3,5		

Composição obtida a partir de informações do fabricante.

A dieta experimental caracterizada por ser hipercalórica (AIN), foi comprada na forma emblocada (PRAG SOLUÇÕES®, São Paulo, Brasil). Ela fornece cerca de 515Kcal a cada 100 gramas consumidas (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição da dieta experimental AIN-93 modificada

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%
Amido de milho	59,50	238	4,6
Caseína	200	800	15,5
Amido dextrinizado	40	160	3,1
Sacarose	100	400	7,8
Óleo de soja	50	450	8,7
Celulosa microcristalina	50	0	0,0
Mix mineral AIN 93G	35	0	0,0
Mix Vit. AIN 93	10	40	0,8
L cistina	3	12	0,2
Bitartaro de colina	2500	0	0
Dextrose	100	400	7,8
Frutose	100	400	7,8
Banha	250	2250	43,7
BHT	0,050	0	0

Composição obtida a partir de informações do fabricante.

O consumo alimentar foi acompanhado pelo método do resto ingesta. A dieta era oferecida uma vez por semana *ad libitum* e a cada troca anotava-se a quantidade de dieta que sobrava, descontando o comedouro. Após, o mesmo era higienizado e uma nova dieta era colocada. O resto ingesta se deu pela subtração entre a quantidade de dieta ofertada e a “sobra” da mesma.

A ingesta hídrica foi acompanhada semanalmente. A água era oferecida uma vez por semana *ad libitum*, a cada troca anotava-se a o volume total oferecido e subtraía pelo volume restante. Os camundongos tiveram acesso à água potável em todos os momentos durante o tratamento e, além disso, utilizava-se as mesmas mamadeiras identificadas de acordo com cada grupo, a fim de evitar contaminações.

O controle do peso corporal dos animais foi realizado através de uma balança digital (FILIZOLA P.3®; São Paulo; Brasil). A pesagem acontecia de forma individualizada, na qual cada animal era colocado na balança dentro de um recipiente.

5.2 Protocolo de preparo do 4-NQO e tratamento

O protocolo de preparo do 4NQO seguiu os critérios estabelecidos por Tang *et al.* (2004). Inicialmente, o 4NQO foi pesado e colocado em eppendorfs e, posteriormente, armazenados em geladeira para estoque quinzenal. Para a confecção de cada solução carcinogênica foi diluído 0,225 gramas de 4NQO em 45 mL de propilenoglicol, homogeneizada por 24 horas. Posteriormente, realizava-se uma nova diluição desta solução em 4,5 litros de água potável, para obtenção da concentração final de 50 µg/mL.

5.3 Eutanásia e coleta de sangue

Ao final na 23ª semana, os animais foram colocados em jejum de 8 horas, antes da realização da eutanásia. Essa, foi realizada através da retirada de sangue periorbital, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.4 Índice de Lee

O Índice de Massa Corporal (IMC) de cada animal foi avaliado através do Índice de Lee (NOVELLI *et al.*, 2007). No dia da eutanásia, foi realizado a pesagem dos animais ainda vivos e, após o procedimento, realizou-se a medida corporal, em centímetros, de cada animal, através da extensão nasoanal e assim, obteve-se os valores da composição corporal (comprimento e peso). O cálculo do Índice de Lee se

dá através da raiz cúbica do peso em gramas, dividido pela extensão do animal em centímetros (NOVELLI *et al.*, 2007). Segundo Bernardis e Patterson (1968), valores de referência do Índice de Lee que forem iguais ou superiores a 0,3g/cm³, indicam obesidade.

5.5 Medição dos níveis de glicose em jejum

O teste de glicemia foi realizado apenas no dia da eutanásia, por um medidor de glicose utilizado em adultos (G-TECH life®; São Paulo; Brasil). Para a detecção dos níveis glicêmicos, uma tira reagente foi inserida no medidor e, após o comando do mesmo, uma gota de sangue era colocada na tira, e em cerca de 10 segundos, o valor da glicemia era informado. Para cada animal foi utilizado uma fita reagente.

5.6 Coleta de órgãos e tecidos

Os órgãos coletados foram a língua e os linfonodos regionais de cada animal. Para a retirada da língua foi realizado glossectomia e, posteriormente uma dissecação para retirada dos linfonodos. Todos os órgãos foram colocados em frascos previamente identificados contendo formalina 10% para a realização do processamento histológico.

5.7 Processamento histológico

Para as análises histológicas foram selecionados língua e linfonodos de todos os animais. No processamento histológico os fragmentos foram colocados em água corrente por duas horas, para a retirada do excesso de formol. Os fragmentos passaram por desidratação em série crescente de etanol (DINÂMICA QUÍMICA CONTEMPORÂNEA®), organizados da seguinte forma: álcool 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, por nove minutos. Em seguida, foi iniciado a diafanização em Xilol (NEON®) com álcool xilol I, xilol II e xilol III, por 25 minutos cada.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa (QUIMIS Q-316.22®; Diadema; São Paulo; Brasil), para realização do banho de parafina (HISTOSEC PASTILHA MERK®) a 60°C por duas horas. Após esse processo, os fragmentos foram incluídos em parafina a fim da obtenção dos blocos de parafina. Foram realizados 10 cortes seriados com 5µm de espessura, com o auxílio do micrótomo (LEICA RM 2145®; Ramsey; USA).

Os cortes foram colocados em banho maria (CINTERQUAL BH2015®; Lupetec; Setúbal; Portugal) a uma temperatura de 40°C, sendo colocados 2 cortes em

cada lâmina identificada com as informações do grupo, animal e órgão. As lâminas foram transferidas para a platina aquecedora (OLIDEF CZ V.V®; Ribeirão Preto; São Paulo; Brasil), onde permaneceram por 1h para fixação do corte a 40°C. Para a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE), a parafina foi eliminado com banhos sucessivos de xilol I, II, III (NEON®) e em seguida hidratado com série de etanol em concentração decrescente de álcool absoluto I, II, III e álcool 95% (Dinâmica QUÍMICA CONTEMPORÂNEA®) e água corrente por 5 minutos. Após, iniciou-se o processo de coloração com Hematoxilina por 50 segundos, lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos e coloração com Eosina por 50 segundos.

Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto e xilol, por 5 minutos cada. Ao final as lâminas foram montadas utilizando o meio para montagem de lâminas Entellan (SIGMA®; EUA) e secaram em temperatura ambiente para a análise histopatológica.

5.8 Análise microscópica

O diagnóstico histopatológico foi realizado por dois patologistas orais experientes de acordo com os critérios de graduação patológicos de displasia epitelial descritos pela OMS em 2006 (THOMPSON, 2006)

5.8.1 Exame microscópico da língua

Para classificação final de cada camundongo em relação ao tipo de lesão desenvolvida, foi considerada a lesão de maior grau presente no campo e categorizado da seguinte forma: sem lesão, displasia leve, moderada e grave e carcinoma de células escamosas (SLOOTTWEG; EVESON, 2005).

5.8.2 Exame microscópico dos linfonodos

A incidência de metástase loco-regional/camundongo/grupo foi determinada pelo número de focos metastáticos presente no interior dos linfonodos regionais, levando em consideração na contagem a ausência de contiguidade entre eles.

5.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no *Graph Pad Prism* (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA). Os dados foram submetidos aos testes de normalidade D'Agostino & Pearson e à análise de variância ANOVA. Os dados do consumo hídrico, ganho de peso corporal e níveis glicêmicos dos camundongos foram analisados através do pós-teste

de Tukey. As alterações histopatológicas nas amostras oriundas de animais tratados com 4NQO foram analisadas através do teste qui-quadrado. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Consumo hídrico

Os animais receberam água e 4NQO *ad libitum*. Ao final do experimento foi realizado o cálculo do consumo hídrico semanalmente de cada grupo. A figura 1 mostra que o grupo DPA/H₂O teve o maior consumo hídrico quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). Além disso, animais dos grupos experimentais (AIN/4NQO e DPA/4NQO) apresentaram um menor consumo hídrico quando comparados aos grupos controles (AIN/H₂O e DPA/H₂O).

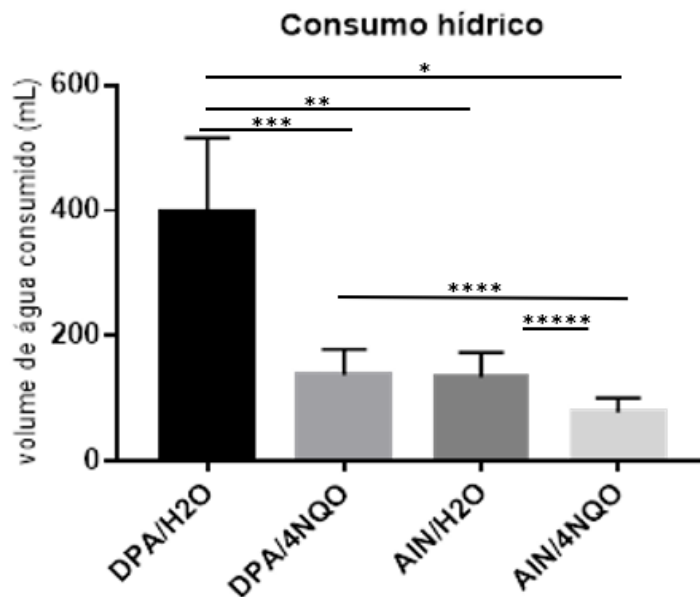


Figura 1: Consumo hídrico ao longo de 23 semanas. O gráfico representa a ingestão hídrica média por grupo semanal ao longo das 23 semanas de estudo. Teste de Tukey. (*) $P < 0,0001$, asterisco duplo (**) indica $P < 0,0001$, asterisco triplo (***) indica $P < 0,0001$, asterisco quadruplo (****) indica $P < 0,0152$, asterisco quártuplo (*****) indica $P < 0,0244$.

6.2 Análise do consumo dietético – resto ingesta

Análises do consumo das dietas mostraram que camundongos alimentados com a dieta padrão e água *ad libitum* tiveram maior consumo de dieta quando comparado aos demais grupos. O consumo semanal médio de dieta observado para os grupos tratados com 4NQO foi de $134,04g \pm 43,97$ e $84g \pm 24,04$, contra $199,30g \pm 41,09$ e $86g \pm 34$ pelos grupos não tratados com 4NQO (figura 2). O consumo médio semanal por animal de cada grupo foi em média de $5,58g$ e $4,42g$ em animais induzidos à carcinogênese, $18g$ e $12g$ para roedores que ingeriram apenas água.

A análise da quantidade de calorias ingeridas mostrou que o grupo DAP/H₂O ingeriu mais calorias comparado aos outros grupos. Além disso, os animais expostos ao 4NQO e alimentados com a dieta hipercalórica, apresentaram um menor consumo de calorias quando comparados ao grupo que ingeriu a dieta padrão. Os dados mostram que ao longo de cada semana animais dos grupos DPA/H₂O, DPA/4NQO, AIN/H₂O E AIN/4NQO, consumiram 66.536Kcal \pm 18.192, 45.574Kcal \pm 14.952, 44.469Kcal \pm 17.511 , 43.238Kcal \pm 12.383, respectivamente (Figura 3). A ingesta de calorias por animal dos respectivos grupos acima em média foi de 6048Kcal, 1898Kcal, 6352Kcal e 2402Kcal.

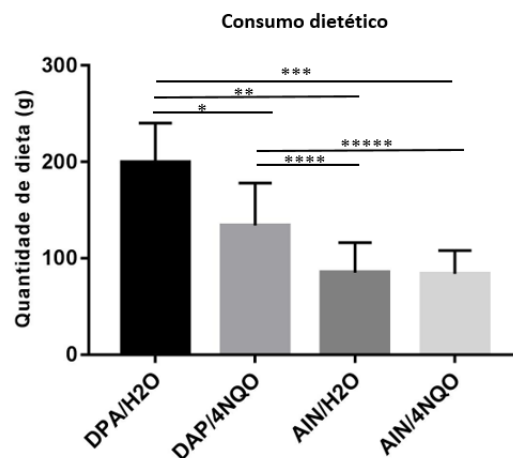


Figura 2: Consumo médio de gramas ingeridas pelos camundongos. O consumo médio semanal por animal de cada grupo foi em média de 5,58g e 4,42g em animais induzidos à carcinogênese, 18g e 12g para roedores que ingeriram apenas água. Teste de Tukey. (*), (**), (***) , (****) e (*****) indica $P < 0,0001$.

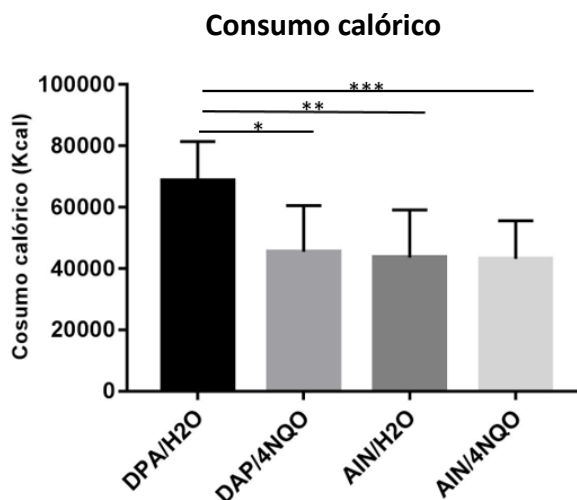


Figura 3: Consumo médio de calorias ingeridas pelos camundongos. Os dados mostram que ao longo de cada semana a ingesta de calorias por animal dos respectivos grupos acima foi em média foi de 6048Kcal, 1898Kcal, 6352Kcal e 2402Kcal. Teste de Tukey. (*), (**), (***) indica $P < 0,0001$.

6.3 Ganho de peso corporal

Ao final da 23ª semana evidenciou-se que, 100% dos animais dos grupos controle e experimental apresentaram ganho de peso relevante quando comparados entre si. Teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) (Figura 4).

A figura 4 também mostra que, os grupos AIN/4NQO e AIN/H2O não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados entre si ($p = 0,3461$).

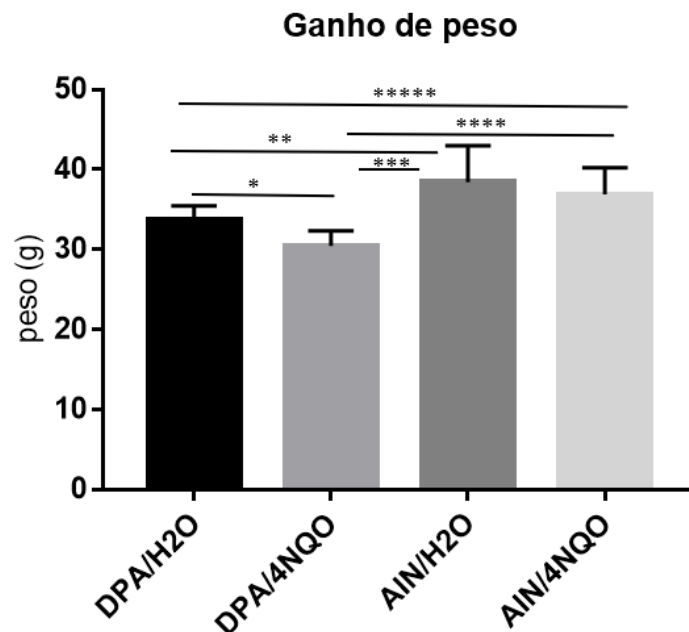


Figura 4: Ganho de peso corporal ao final da 23ª semana. Observou-se que, 100% dos animais apresentaram ganho de peso significativo ao longo de 23 semanas. Teste de Tukey. (*) indica $P < 0,0034$, (**) indica $P < 0,0001$, (***) indica $P < 0,0001$, (****) indica $P < 0,0001$, (*****) indica $P < 0,0044$.

6.4 Índice de Lee

Os resultados obtidos mostraram que 100% dos animais alimentados com a dieta experimental (AIN-93 modificada) apresentaram valores que indicavam obesidade. Em relação aos grupos alimentados com a dieta padrão, apenas no DPA/H2O foi observado índice de obesidade. Enquanto, os animais do grupo DPA/4NQO foram considerados eutróficos, pois mantiveram seus índices abaixo de $0,3\text{g}/\text{cm}^3$ (Tabela 4).

Tabela 4- Média do peso corporal e Índice de Lee ao final das 23 semanas.

	Média de peso (g)	Índice de Lee (g/cm ³)
AIN/4NQO	37,07 ± 3,30	0,32
DPA/4NQO	30,34 ± 1,93	0,29
AIN/H2O	38,42 ± 4,17	0,33
DPA/H2O	33,60 ± 2,03	0,31

Os resultados experimentais N=59 am a média de peso e o Índice de Lee obtido no final da 23ª semana de

6.5 Níveis glicêmicos

Os dados obtidos de glicose mostram que camundongos expostos ao 4NQO apresentaram níveis glicêmicos elevados. O grupo DPA/H2O não apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos DPA/4NQO e AIN/4NQO (P= 0,6581 e 0,8547). Os grupos experimentais AIN/4NQO e DPA/4NQO apresentaram diferenças entre si ($p = 0,05$). Já os grupos controles, DPA/H2O e AIN/H2O tiveram diferenças em seus resultados. Ambos os grupos experimentais DPA/4NQO e AIN/4NQO apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle AIN/H2O (Figura 5).

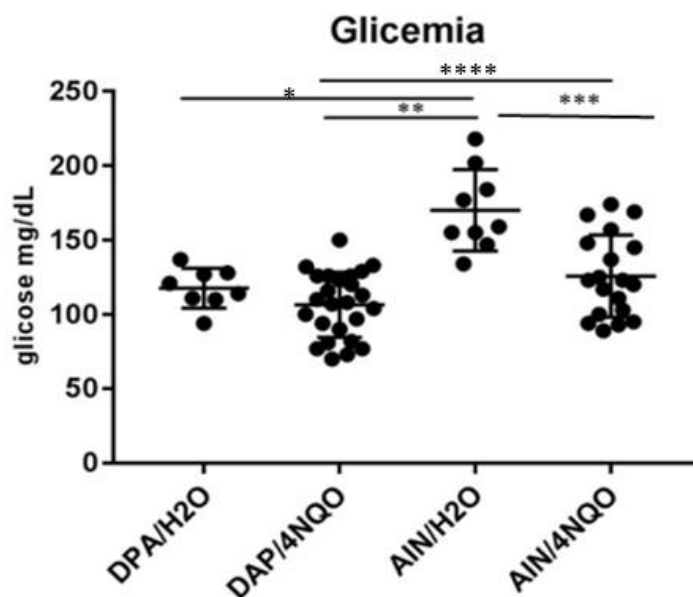


Figura 5: Análises glicêmicas de camundongos tratados ou não com 4NQO e dietas hipercalórica e padrão. O gráfico representa os grupos que apresentaram alterações

nos níveis glicêmicos. Teste de Tukey. (*) indica $P < 0,0002$, (**) indica $P < 0,0001$, (***) indica $P < 0,0001$, (****) indica $P < 0,05$.

6.6 Mortalidade e sobrevida

Nos índices de mortalidade e sobrevida ao longo das 23 semanas, observou-se que os grupos expostos à carcinogênese apresentaram maior mortalidade quando comparados aos expostos a água. O grupo AIN/4NQO foi o que apresentou o maior índice de mortalidade, seguido pelos DPA/4NQO e AIN/H₂O, respectivamente. O grupo DPA/H₂O não apresentou nenhum óbito até o final do experimento, apresentando assim, a maior sobrevida entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Mortalidade e sobrevida dos camundongos.

Grupos	Semana 1	Semana 6	Semana 15	Semana 16	Semana 21	Semana 23	Total
AIN/4NQO	3	0	1	0	0	3	7
DPA/4NQO	0	2	0	1	1	1	5
AIN/H ₂ O	3	0	0	0	0	1	4
DPA/H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0

6.7 Macroscopia da língua

Nas análises macroscópicas foi possível identificar lesões na língua em 100% dos camundongos tratados com 4NQO (Figura 6).



Figura 6: Lesões em línguas de camundongos expostos ao 4NQO. A imagem apresenta lesões por toda a extensão da língua. N= 41.

6.8 Análise histopatológica da língua

As análises histológicas da língua mostraram que 100% dos camundongos tratados com 4NQO desenvolveram alterações macroscópicas (figura 7B, 7C e 7D). Dentre as alterações que acometeram as línguas dos animais expostos ao 4NQO, destaca-se a displasia leve/moderada (Figura 8). As alterações de displasia presentes não apresentaram diferenças significativas ($P= 0,2778$). Na avaliação da presença de carcinomas dos grupos expostos ao 4NQO, 50% dos animais apresentaram áreas com carcinomas (figura 10). Todavia, não houve diferenças significativas entre os grupos ($P= 0,7245$).

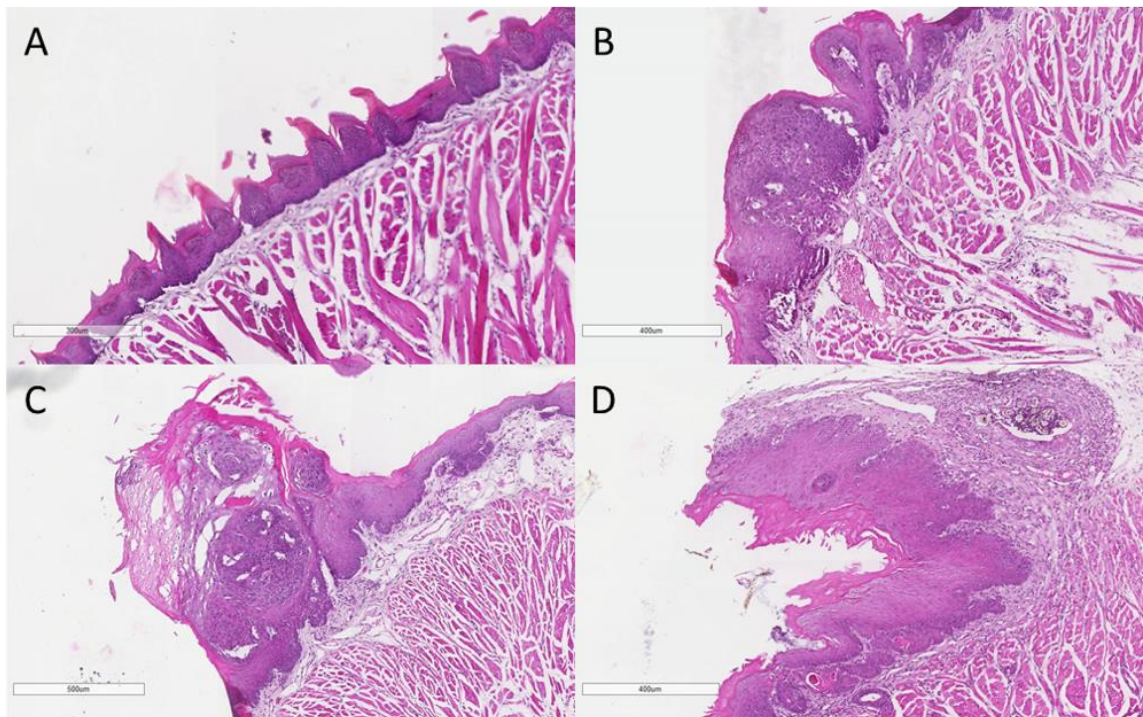


Figura 7: Corte histológico da língua de camundongos c57/BL6 tratados ou não com 4NQO e dieta hipercalórica. As imagens representam os aspectos histológicos observados nos diferentes grupos de estudo. **A** epitélio normal; **B** displasia leve/moderada; **C** displasia intensa; **D** carcinoma. Coloração Hematoxilina e Eosina.

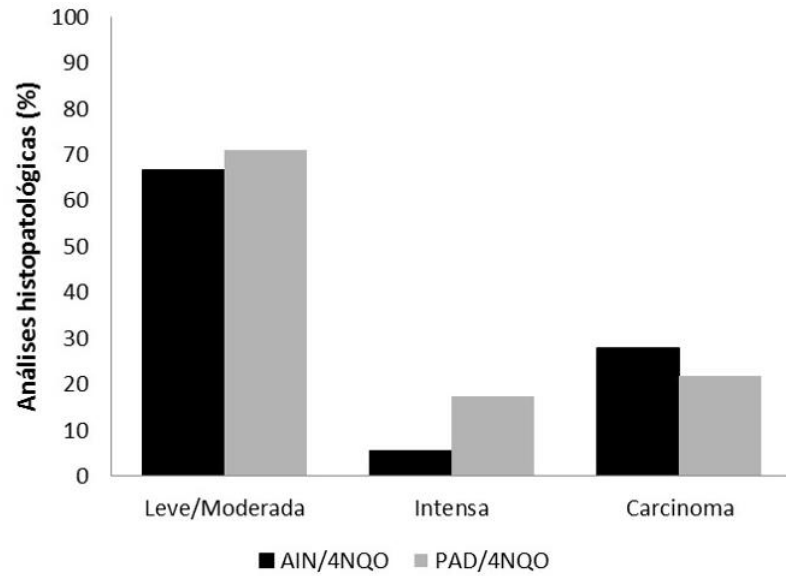


Figura 8: Distribuição das alterações histopatológicas presentes na língua de camundongos c57/BL6 tratados com 4NQO associado ou não com a dieta hipercalórica. N=41.

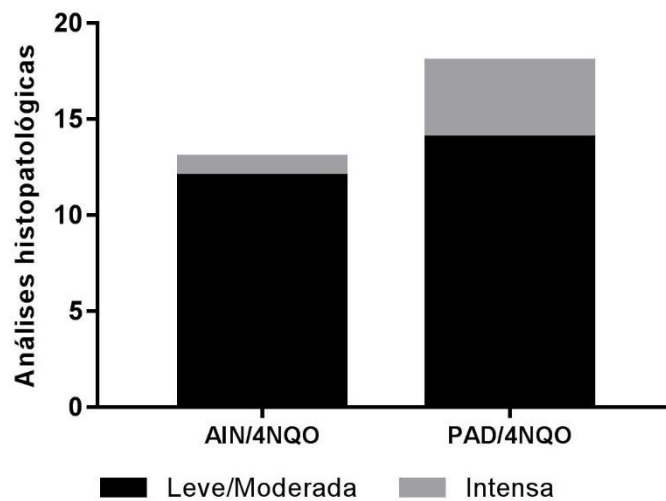


Figura 9: Comparação das alterações de displasia leve/moderada e intensa presentes nas línguas de camundongos tratados com 4NQO associado ou não com a dieta hipercalórica. Teste qui-quadrado ($P = 0.2778$). N=41

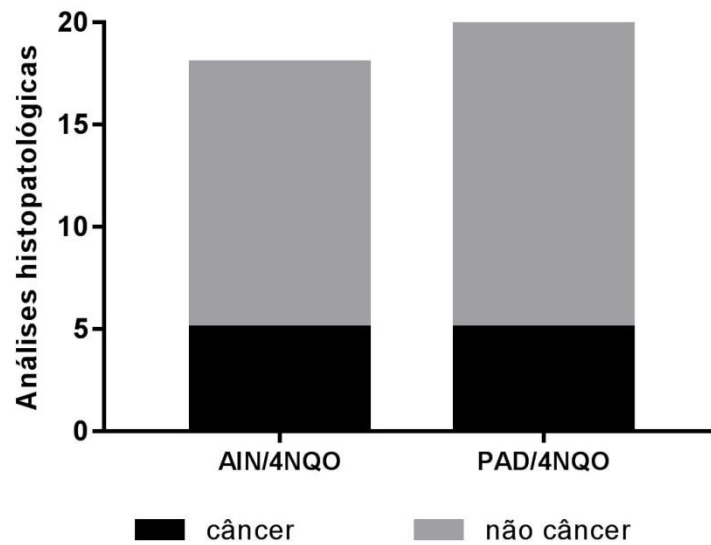


Figura 10: Presença de carcinomas nos grupos expostos ao 4NQO. O gráfico representa o número de animais tratados com 4NQO que desenvolveram carcinoma. Os cortes histológicos corados com HE apresentam áreas com presença de carcinoma para ambos os grupos. N=41. Teste qui-quadrado ($P = 0.7245$).

6.9 Análise histopatológica dos linfonodos

As análises microscópicas demonstraram ausência de focos metastáticos em linfonodos de animais tratados com 4NQO. Em relação aos grupos não tratados com 4NQO, os linfonodos de todos os animais apresentaram epitélio sem alterações.

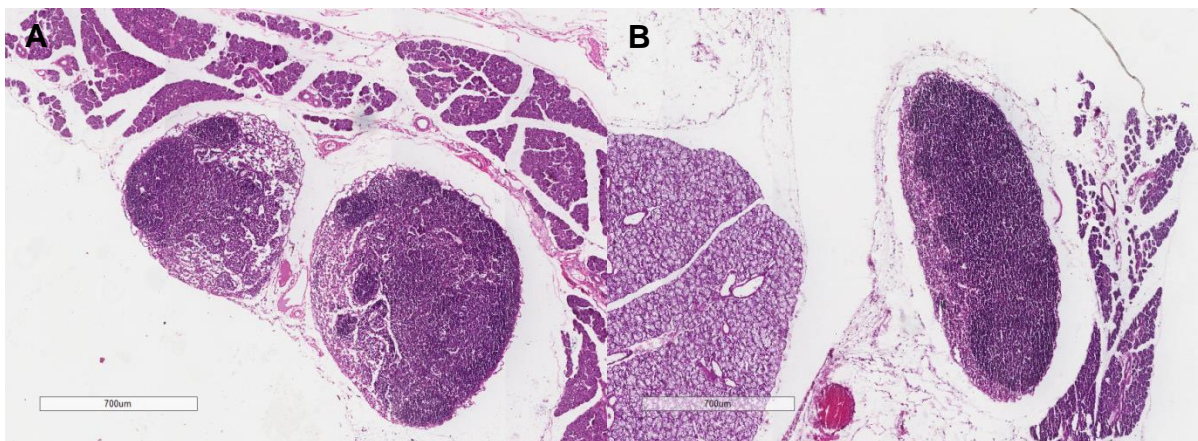


Figura 11: Corte histológico dos linfonodos de camundongos c57/BL6. As figuras A e B mostram ausência de alterações no epitélio dos linfonodos. Coloração Hematoxilina e Eosina.

7. DISCUSSÃO

A obesidade tem sido atribuída como um fator contribuinte para progressão de alguns tipos de cânceres (KYRGIUO *et al.*, 2017; AVGERINOS *et al.*, 2018; SUNG *et al.*, 2019). Entretanto, a relação entre obesidade e o desenvolvimento de carcinomas na língua não está bem definido. Nesse sentido, o presente trabalho investigou a possível correlação entre obesidade e o desenvolvimento de cânceres na língua em camundongos C57/BL6 expostos ao 4NQO. Nossos dados mostraram que embora haja uma aparente associação positiva entre dieta hipercalórica e carcinógeno no estabelecimento de tumores na língua (AIN/4NQO 28% vs PAD/4NQO 22%), tais diferenças não são consideradas significativas.

Vários tipos de dietas são utilizados para induzir à obesidade em modelos animais (ZHANG *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016; PICKLO *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2021). Em recente estudo foi observado que camundongos da linhagem C57/BL6 alimentados com uma dieta que apresentava 51% de banha de porco como fonte de lipídeos e fornecia 332Kcal/100g, passaram a ingerir menores quantidades de dieta. (LANG *et al.*, 2019). Esses dados corroboram com os nossos achados, uma vez que, os animais alimentados com a dieta experimental (AIN-93 modificada) apresentaram um menor consumo quando comparados aos que ingeriram a dieta padrão balanceada.

A dieta AIN-93 modificada possui em sua composição 43,7% de banha de porco e fornece 515Kcal/100g, fornecendo maior saciedade aos animais, devido ao elevado número de calorias oferecidas. Embora tenham consumido uma dieta que fornece maior quantidade de calorias, os grupos AIN/4NQO e AIN/H₂O apresentaram uma menor quantidade de calorias ingeridas quando comparados aos grupos DPA/4NQO e DPA/H₂O, sugerindo que a progressão das lesões na região da língua, provenientes do alto teor de gordura associado ao 4NQO, tenham atrapalhado o consumo. Além disso, em relação ao número de calorias ingeridas por cada animal, evidenciou-se que roedores tratados com a dieta AIN-93 modificada apresentaram uma menor ingesta calórica, quando comparados aos que ingeriram a dieta padrão balanceada. Nossos dados contradizem os achados do estudo de Lang *et al.* (2019), no qual camundongos tratados com uma dieta hiperlipídica, apresentaram uma quantidade de calorias ingeridas significativamente maior (LANG *et al.*, 2019).

O consumo excessivo de dietas com alto teor de gordura associado ao estilo de vida sedentário é um fator predisponente à obesidade. Em roedores, o grau de obesidade é indicado através do Índice de Lee, no qual valores a partir de $0,3\text{g}/\text{cm}^3$ indicam obesidade (BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D., 1968). Os dados apresentados mostraram que camundongos alimentados com a dieta hipercalórica por vinte e três semanas, apresentaram ganho de peso excessivo ao final do experimento, corroborando com dados obtidos a partir de outros estudos (MIRANDA J. *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2018; LANG P. *et al.*, 2019; PENG J. *et al.*, 2021). Entretanto, observou-se que animais alimentados com dieta balanceada também ficaram obesos, o que pode ser explicado pela ingestão *ad libitum*, consumo abundante e a ausência de exercícios físicos.

Nossos achados mostraram que a dieta AIN-93 modificada induz obesidade em camundongos após vinte e três semanas de exposição à mesma, corroborando com os dados obtidos por outros grupos de pesquisa (BORBA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013; TUOMINEN *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2016). O consumo excessivo de calorias associado ao sedentarismo, implica em uma balança energética positiva, ou seja, a quantidade consumida excede o gasto energético, assim facilitando o ganho de peso e, conseqüentemente a condição de obesidade. De fato, nossos dados evidenciaram que 100% dos camundongos alimentados com a dieta hipercalórica apresentaram índices superiores a $0,3\text{g}/\text{cm}^3$. Sobretudo, 100% dos animais que ingeriram a dieta balanceada também obtiveram valores que indicaram obesidade, o que confirma a influência dos fatores predisponentes.

Estudo recente relata que a obesidade induzida em roedores, pode ocasionar alterações metabólicas características do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (MAGALHÃES *et al.*, 2019). Sendo assim, o acúmulo excessivo de lipídeos é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus (DM). A associação entre obesidade e DM favorece o desenvolvimento de neoplasias (E-CASTRO e GUERRA-JUNIOR, 2005). Os mecanismos biológicos que relacionam a obesidade à iniciação do câncer incluem anormalidades no eixo IGF-I e resistência à insulina (GALLAGHER e LEROITH, 2010; GAHETE *et al.*, 2014). Em recente estudo foi observado que camundongos obesos, diabéticos e com dislipidemia induzidos ao 4NQO, apresentaram um maior número de tumores orais e esofágicos quando comparados ao grupo saudável (TANAKA *et al.*, 2017). Nossos dados apontaram que

roedores induzidos à carcinogênese e alimentados com uma dieta hipercalórica por um período prolongado, apresentaram alterações metabólicas indicativas de resistência insulínica e DM, evidenciando um prognóstico negativo do câncer decorrente da associação entre uma dieta hipercalórica e DM. Além disso, nossos achados mostram níveis glicêmicos elevados em roedores que ingeriram a dieta padrão e 4NQO, sugerindo que a dieta padrão *ad libitum* induziu a obesidade, essa por sua vez desencadeou uma desregulação metabólica no organismo dos camundongos.

Nossos achados mostraram que animais dos grupos experimentais tratados com 4NQO apresentaram maior índice de mortalidade, enquanto o grupo alimentado com a dieta padrão balanceada e água obteve índices de sobrevivência iguais a 100%. Sobretudo, o grupo experimental induzido à carcinogênese e dieta experimental apresentou a maior taxa de mortalidade, sugerindo que uma dieta hipercalórica pode promover alterações no ambiente tumoral e favorecer um mau prognóstico para o CCEB.

Após exposição ao 4NQO por vinte e três semanas, camundongos dos grupos experimentais apresentaram alterações visíveis na língua. Caracterizavam-se por lesões verrucosas com placas brancas espalhadas por toda a extensão da língua. A olho nu não houve diferenças perceptíveis das lesões entre os grupos AIN/4NQO e DPA/4NQO. Comparando-os entre si, 100% dos animais induzidos à carcinogênese, apresentaram lesões na língua características de pré-neoplásicas. Não foram identificadas lesões em outras regiões da cavidade oral.

Em recente estudo, lesões pré-malignas com placas brancas, hiperplasia granular branca verrucosa com aspecto de couve-flor e flocos foram encontradas em línguas de camundongos tratados com dieta hiperlipídica ou padrão e expostos ao 4NQO. Outro fato importante foi que o número de lesões visualizadas foi significativamente maior no grupo alimentado com uma dieta rica em gordura (PENG *et al.*, 2021). Esses dados corroboram com nossos achados, uma vez que camundongos tratados com 4NQO apresentaram lesões por toda a extensão da língua com características semelhantes. Entretanto, nossos dados mostraram um acometimento de lesões pré-malignas em 100% dos camundongos tratados com 4NQO.

Em nossas investigações foram observadas alterações histopatológicas nas línguas de camundongos tratados com 4NQO e alimentados com a dieta hipercalórica. As alterações histológicas apontam áreas de displasia leve/moderada, intensa e a presença de carcinomas no epitélio. Entre as alterações, a displasia leve/moderada acometeu 67% dos animais, seguida de 5% da displasia intensa e 28% apresentaram carcinomas em seu epitélio. A displasia intensa foi observada mais acentuada no grupo DPA/4NQO, acometendo 17% dos animais. Entretanto, quando comparado as displasias leve/moderada e intensa de ambos os grupos, evidenciou-se uma maior incidência de displasia leve/moderada nos grupos tratados com 4NQO. Ademais, não foram encontrados focos metastáticos nos linfonodos em nenhum dos grupos expostos ao 4NQO, dados que corroboram com o estudo de Peng *et al* (2021).

O estudo de PENG *et al.*, (2021), aponta que uma dieta hiperlipídica acelerou a carcinogênese em animais tratados com 4NQO. Cerca de 70% dos camundongos apresentaram displasia intensa e 25% carcinoma invasivo na língua. Entretanto, em nossos achados observou-se que a dieta hipercalórica não aumenta o desenvolvimento de CCEB. Sobretudo, o estudo induziu a carcinogênese utilizando o dobro da concentração que o nosso trabalho utilizou (100µg/mL) e promoveu a obesidade com uma dieta hiperlipídica por 20 semanas (PENG *et al.*, 2021). Estes achados associados à presença de lesões na língua de todos os camundongos tratados com 4NQO indicam o favorecimento do CCEB. Porém, podemos sugerir que fatores como o tempo de exposição e a concentração do carcinógeno, podem interferir no acometimento de carcinomas na língua.

Em nossos achados, observou-se alterações histopatológicas nas línguas de camundongos tratados com 4NQO e dieta padrão. A displasia leve/moderada foi visualizada em 61% dos camundongos, enquanto a presença de carcinomas foi observada em 22% dos animais. No estudo de Peng *et al.* (2021), 60% dos animais expostos ao 4NQO e alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura, apresentaram alterações de displasia moderada em seu epitélio, enquanto nenhum carcinoma foi encontrado, contradizendo nossos dados. Entretanto, em nossos achados a relação obesidade x câncer não pôde ser observada, pois os animais tratados com a dieta padrão também ficaram obesos. Sugere-se então, que o aumento da ingesta de calorias não tem uma relação direta com o surgimento de neoplasias na língua.

Embora o agravamento de várias doenças esteja associado à obesidade, os dados exibidos não foram conclusivos a tal inferência. A relação entre obesidade e CCEB ainda não se encontra de forma estreita. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer se a obesidade contribuiu ou não para o estabelecimento e progressão de na língua. Nossos resultados contribuem para a compreensão do papel de uma dieta na iniciação e desenvolvimento do câncer e no avanço dos estudos acerca da correlação, enfatizando as alterações decorrentes da condição de obesidade.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a indução à carcinogênese associada a uma dieta hipercalórica promoveu um baixo consumo hídrico em 100% dos animais que foram tratados com o 4NQO e em 50% dos animais que ingeriram apenas água.

Em relação ao consumo dietético, observou-se um menor consumo alimentar em 100% dos animais alimentados com a dieta hipercalórica.

Todos os animais do experimento apresentaram ganho de peso significativo ao final da 23ª semana. Além disso, a obesidade foi observada 100% dos camundongos.

Animais tratados com o 4NQO apresentaram um índice de mortalidade de 30%. Entretanto, camundongos não expostos a carcinogênese e alimentados com uma dieta padrão apresentaram o maior índice de sobrevivência.

A análise macroscópica das línguas mostrou a presença de lesões pré-neoplásicas em 100% dos animais induzidos à carcinogênese.

A análise microscópica das línguas evidenciou achados de displasia leve/moderada em 61% dos animais alimentados com a dieta hipercalórica, enquanto que a displasia intensa foi observada em 17% dos animais que ingeriram a dieta padrão. Além disso, em 50% dos camundongos tratados com o 4NQO observou a presença de carcinoma.

Não foram observados focos metastáticos em linfonodos regionais dos animais do estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R.C.; BALTAR, V.T.; MARCHIONI, D.M. Breast cancer and dietary patterns: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 72, n.1, p. 1-17, 2014.
- AMTHA, R. *et al.* Dietary patterns and risk of oral cancer: a factor analysis study of a population in Jakarta, Indonesia. **Oral Oncology**, v. 45, n. 8, p. e49-53, 2009.
- AVGERINOS K. I *et al.* Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism Clinical e Experimental**. v. 92, p. 121-135, Mar. 2018.
- BAUMAN, J.E. *et al.* Prevention of Carcinogen-Induced Oral Cancer by Sulforaphane. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 7, p. 547-557, 2016.
- Barnes *et al.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v.40, n. 527, 1968.
- BORBA, A.J.; *et al.* Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 24, p.519-528, 2011.
- BRADSHAW, P.T. *et al.* Associations between dietary patterns and head and neck cancer: the Carolina head and neck cancer epidemiology study. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, n. 12, p. 1225-1233, 2012.
- BRAVI, F. *et al.* Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2904-2910, 2013.
- CALLE, E. E. *et al.* Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults, **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 17, p. 1625-1638, 2003.
- CHAN, S.W.; READE, P.C. The role of ascorbic acid in oral cancer and carcinogenesis. **Oral Diseases**, v. 4, n. 2, p. 120-129, 1998.
- CHEN Y. L. ERK Activation Modulates Cancer Stemness and Motility of a Novel Mouse Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line. **Cancers**, v. 12, n. 1, 2019.

- CHOI, Y. *et al.* Increased expression of FGF1-mediated signaling molecules in adipose tissue of obese mice. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 157-167, 2016.
- DAVIES, M. *et al.* Loss of differentiation of 4NQO induced rat malignant oral keratinocytes correlates with metastatic dissemination and is associated with a reduced cellular response to TGF α 1 and an altered receptor profile. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 9, p.397-405, 1999.
- DAYAN, D. *et al.* Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncology**, v. 33, n. 2, p. 105-109, 1997.
- DE PERGOLA G, SILVESTRIS F. Obesity as a major risk factor for cancer. **Journal of Obesity**. v. 2013, 2013.
- E CASTRO, A. M. S.; GUERRA-JUNIOR, G. GH/IGF e neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.49, n. 5, p.833-842, 2005.
- FOWLER, M.E.; AKINYEMIJU, T.F. Meta-analysis of the association between dietary inflammatory index (DII) and cancer outcomes. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 11, p. 2215-2227, 2017.
- FRACALOSSO, A. C. *et al.* Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 4, p.325-333, 2011.
- GAHETE, M. D. *et al.* Elevated GH/IGF-I promotes mammary tumors in high-fat, but not low-fat, fed mice. **Carcinogenesis**, v. 35, p. 2467-2473, 2014.
- GALLAGHWE, E. J.; LEROITH, D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 610-618, 2010.
- GEHRKE, J.; PEREIRA, R. Z. Associação do fato de necrose tumoral alfa (TNF-a) com a obesidade. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 1, 2007.
- GREGG E. W. *et al.* Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults, **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 15, p. 1868-1874, 2005.

IDE, F. *et al.* Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 567-572, 2001.

ISHIDA, K. *et al.* Current mouse models of oral squamous cell carcinoma: Genetic and chemically induced models. **Oral Oncology**, v. 73, p. 16-20, 2017.

IYENGAR, N. M. *et al.* Impact of obesity on the survival of patients with early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Câncer**, v. 120, p. 983 – 991, 2014.

KANDARKAR, S.V.; SAWANT, S.S.; READE, P.C. Ultrastructural changes to the palatal mucosa of rats following the application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) and vitamin C. **Oral Oncology**, v. 34, n. 4, p. 247-252, 1998.

KARUNANITHI, S.; LEVI, L. High-fat diet and colorectal cancer: myths and facts. **Future Oncology**, 2018.

KUMAR, V. *et al.* Robbins: Patologia Básica, Elsevier, v. 9, Rio de Janeiro, 2013.

KYRGIU, M. *et al.* Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. **BMJ**, v. 356, 2017.

LANG, P. *et al.* Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

LAUBY-SECRETAN, B. *et al.* International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.

LEITE, L. D.; ROCHA, E. D. M.; NETO, J. B. Obesidade: uma doença inflamatória. **Ciência e Saúde**, v. 2, n. 2, 2009.

LIM S. M, *et al.* Germinated brown rice ameliorates obesity in high-fat diet induced obese rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n.140, 2016.

MAGALHÃES, D. A. *et al.* High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, p. 2-14, 2019.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Obesidade**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/ultimas-noticias/3134-04-3-dia-mundial-da-obesidade#:~:text=Pela%20defini%C3%A7%C3%A3o%20da%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial,24%2C9%20kg%2Fm2>. Acesso em 10 de set. de 2020.

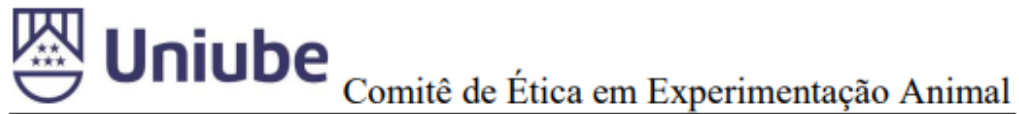
*De acordo com as normas ABNT/2021.

- MIRANDA, J. *et al.* Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 655-666, 2018.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>. Acesso em 01 de fev. 2022.
- NAUTA, J. m. *et al.* Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p.53-58, 1995.
- NOVELLI, E.L.B; *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Labotatory Animals**, v.41, 2007.
- OGHUMU, S. *et al.* Deletion of macrophage migration inhibitory factor inhibits murine oral carcinogenesis: Potential role for chronic pro-inflammatory immune mediators. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 6, p.1379-1390, 2016.
- OLEFSKY, J. M, GLASS C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 219–246, 2010.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). Obesidade e excesso de peso. 2020. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> . Acessado em 10 de set. de 2020.
- PARK, Y.; COLDITZ, G. A. Fresh evidence links adiposity with multiple cancers. **BMJ**, v. 356, 2017.
- PENG, J. *et al.* Diet-induced obesity accelerates oral carcinogenesis by recruitment and functional enhancement of myeloid-derived suppressor cells Jianmin. **Cell Death and Disease**, v. 946, n. 12, p. 2-13, 2021.
- PICKLO, M. J. *et al.* Comparative effects of high oleic acid vs high mixed saturated fatty acid obesogenic diets upon PUFA metabolism in mice. **Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids**, v. 119, p. 25-37, 2017.
- RIVERA C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Clinical Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 2014.
- SALLEY, J. J. Experimental Carcinogenesis in the Cheek Pouch of the Syrian Hamster. **Journal of Dental Research**, v. 33, n.2,1954.

- SALLEY, J. J. Histologic Changes in the Hamster Cheek Pouch During Early Hydrocarbon Carcinogenesis. **Journal of Dental Research**, 1957.
- SCHWARTZ, J. L. Biomarkers and molecular epidemiology and chemoprevention of oral carcinogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n.1, 2000.
- SECCHI, D.G. *et al.* Red meat, micronutrients and oral squamous cell carcinoma of argentine adult patients. *Nutrition Hospital*, v. 32, n.3, p. 1214-1221, 2015.
- SHKLAR, G. Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 2, p. 1768-1773, 1999.
- SLOOTWEG, P.J.; EVESON, J.W. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors**. Lyon, I.A.R.C. Press., p. 166-167, 2005.
- SOUZA, S. A. *et al.* Obesidade adulta nas nações: uma análise via modelos de regressão beta. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 8, p. 1- 12, 2018.
- SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hupe**, v. 13, n.1, 2014.
- STEIDLER, N.E.; READE, P.C. Initiation and promotion of experimental oral mucosa carcinogenesis in mice. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 15, n. 1, p. 4347, 1986.
- STONE, T. W., *et al.* Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. **EBioMedicine**, v. 30, pag. 14–28, 2018.
- SUNG H. *et al.* Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. **Cancer Journal for Clinicians**. v. 69, n. 2, p. 88-112, Mar. 2019.
- TANAKA, T.; KAWABATA, K.; SUGIE, S. 4-Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Tongue and Esophagus Carcinogenesis in Obese and Diabetic TSOD Mice. **World Journal Oncology**, v. 8, n. 4, p. 97-104, 2017.
- TANG, X.H. *et al.* Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 301-313, 2004.
- THOMPSON, L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. **Ear, Nose & Throat Journal**, v. 85, n. 74, 2006.

- TUOMINEN, I.; *et al.* Diet-Induced Obesity Promotes Colon Tumor Development in Azoxymethane-Treated Mice. *PloS one*, v.8, n.4, 2013.
- VIARISIO, D. *et al.* Novel β - HPV49 Transgenic Mouse Model of Upper Digestive Tract Cancer. **Cancer Research**, 2016.
- WANG, X.; *et al.* Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v.10, n. 234, 2011.
- WANI, M.K. *et al.* Cancer induction in the DMBA hamster cheek pouch: a modified technique using a promoter. **The Laryngoscope**, v. 111, n.2, p. 204206, 2001.
- YUAN, E. Aged Oolong Tea Reduces High-Fat Diet-Induced Fat Accumulation and Dyslipidemia by Regulating the AMPK/ACC Signaling Pathway. **Nutrients**, v. 10, n. 2, 2018.
- ZHANG, J. *et al.* Peroxiredoxin 1 has an anti-apoptotic role via apoptosis signal-regulating kinase 1 and p38 activation in mouse models with oral precancerous lesions. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 413-420, 2016.
- ZHANG, T. Ashitaba (*Angelica keiskei*) extract prevents adiposity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. **Food & Function**, v. 1, 2015.
- ZHAO, M.; *et al.* Differential Responses of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats with High-Fat Diet Rich in Lard Oil or Soybean Oil. **Plos one**, v.8, n.11, 2013.
- ZHENG, J. *et al.* Dietary patterns and risk of pancreatic cancer: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 11, p.883-908, 2017.

ANEXO I



Ofício CEEA-075/2018

Uberaba, 30 de outubro de 2018

Ilmo. Prof.

Marcelo Rodrigues Pinto

Assunto: Encaminha processo nº 019/2018, sobre o protocolo de pesquisa "*Efeito do carcinógeno 4- nitroquinolina-1-óxido (4NQO) sobre órgãos e tecidos de camundongos expostos a uma dieta hipercalórica*".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 22/10/2018, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jany F. Bittar".

Prof. Jany F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

